

Análise Fisiológica do Co-cultivo das BPCV *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Azospirillum brasiliense* AbV5 com Plântulas de Trigo *in vitro* sob Condições de Estresse Hídrico.

Fernando Furlan², Andressa Estevam², Camila Gazolla Volpiano¹, Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo¹, Fernanda Cristina Buraslan Neves Pereira¹, Kléber Saatkamp¹, Marise Fonseca dos Santos¹.

¹Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina
CEP 85950-000 Palotina – Paraná - E-mail: camilagazolla@ufpr.br

²UNIOESTE – Departamento de Agronomia
CEP 85960-000 Marechal Cândido Rondon – Paraná

RESUMO

*A cultura de trigo diminui a produtividade devido ao estresse hídrico durante veranicos sulistas. É conhecido o potencial de bactérias promotoras de crescimento vegetal ao associar-se a plantas, estimulando o desenvolvimento e protegendo contra o estresse através da síntese de ácido indol-acético (AIA) e redução da quantidade de etileno. Para testar o efeito de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Azospirillum brasiliense* AbV5 no co-cultivo *in vitro* com plântulas de trigo (CD120 e Frontana) usando um promotor de estresse hídrico, as quantidades de AIA, etileno e proteínas totais foram analisadas. Ambas as bactérias foram capazes de aumentar o AIA, entretanto *H. seropedicae* associa-se melhor com o CD120 e *A. brasiliense* com Frontana. Constata-se o efeito de aumento de ácido alfa-cetobutírico pela presença de *H. seropedicae*, confirmando a ausência da aminociclopropano-1-carboxilato desaminase em *Azospirillum* spp. A proteína total aumentou na presença de bactérias e/ou PEG, podendo indicar morte celular da planta e/ou bactéria.*

Palavras-chave: bactérias promotoras de crescimento vegetal, fitormônios, estresse hídrico, trigo.

INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivado a campo pode estar exposto a diferentes condições de estresse que influenciarão em seu desenvolvimento, crescimento e principalmente em sua produtividade. No sul do Brasil a cultura do trigo sequeiro é limitada por veranicos que consistem em temporadas de estiagem durante períodos chuvosos. Uma maneira de conferir tolerância aos efeitos do estresse causado pelo déficit hídrico e estimular a produtividade vegetal, é a ação de bactérias capazes de se associar com plantas, denominadas promotoras de crescimento vegetal (BPCV), como a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Azospirillum brasiliense* AbV5, ambas diazotróficas¹. Foi comprovado que as BPCV beneficiam a planta de várias formas: sintetizam alguns fitormônios, como o ácido indol-3-acético (AIA), promotor de crescimento vegetal e são capazes de reduzir a quantidade de etileno, conhecido fitormônio do



estresse vegetal ou senescência. A bactéria *H. seropedicae* SmR1 apresenta um diferencial em relação a *A. brasilense* AbV5 – a existência no seu genoma de um gene que codifica a ACC desaminase, enzima que atua decompondo um dos precursores do etileno, o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), em ácido alfa-ceto-butírico (ACB) e amônio². O AIA produzido por ambas as bactérias pode estimular a síntese do ACC pelo aumento da atividade da ACC sintase³ e inibir a transformação do ACC em etileno pela diminuição da atividade da ACC oxidase². O objetivo deste trabalho foi estudar duas variedades de trigo da COODETEC, CD120 e uma cultivar ancestral, “Frontana”, para verificar o efeito fisiológico das bactérias *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* AbV5 em plântulas de trigo *in vitro* com um agente promotor de estresse hídrico no meio de cultivo, o polietilenoglicol (PEG).

MATERIAL E MÉTODOS

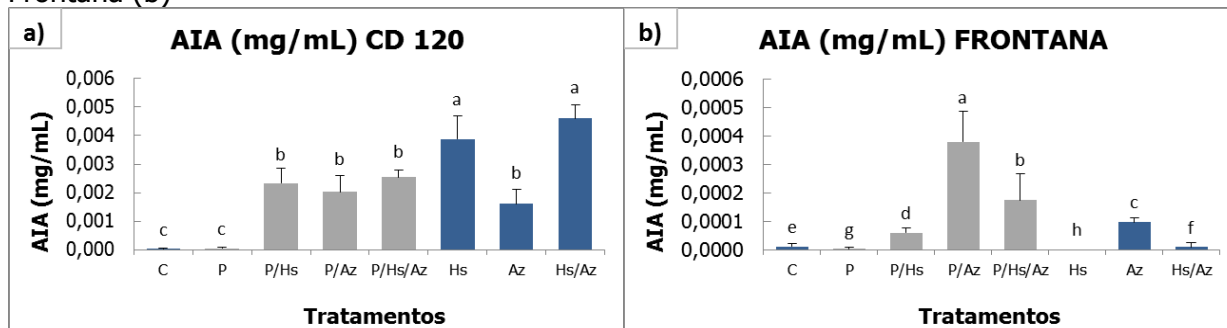
Plântulas obtidas a partir de cultura de embriões maduros foram transferidas após 28 dias de cultivo em meio MS sólido para 10 mL de 1/10 meio MS líquido em tubos de ensaio com ou sem PEG 6000 (-0,3 MPa). Após 24 horas, os tubos foram inoculados com 10^7 células/mL de *H. seropedicae* ou/e 10^6 células/mL de *A. brasilense*, mantendo-se durante 5 dias em co-cultivo. Como controle, as plântulas não inoculadas seguiram as mesmas condições. De forma que os tratamentos foram: C - plântulas em 1/10 meio MS líquido, P - plântulas em 1/10 meio MS líquido com PEG, P/Hs - plântulas em 1/10 meio MS líquido com PEG e inoculadas com *H. seropedicae*, P/Az - plântulas em 1/10 meio MS líquido com PEG e inoculadas com *A. brasiliense*, P/Hs/Az - plântulas em 1/10 meio MS líquido com PEG e inoculadas com *H. seropedicae* e *A. brasiliense*, Hs - plântulas em 1/10 meio MS líquido e inoculadas com *H. seropedicae*, Az - plântulas em 1/10 meio MS líquido e inoculadas com *A. brasiliense*, Hs/Az - plântulas em 1/10 meio MS líquido e inoculadas com *H. seropedicae* e *A. brasiliense*. No final do período experimental 6 amostras de meio de co-cultivo de cada tratamento foram tomadas para a quantificação de AIA pelo método PC⁴, ACB pelo procedimento da 2,4-dinitrofenilhidrazina⁵, e por fim a dosagem de proteínas totais (PTN) foi realizada segundo método de Lowry modificado por Hartree⁶. Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey à nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado nos controles com e sem estresse hídrico (C e P) quantidades insignificantes de AIA produzidas pelas plântulas de cada cultivar em co-cultivo (Fig.1a e Fig.1b). Verificou-se aumento das quantidades de AIA em sistema com bactérias na maioria dos tratamentos para as duas cultivares, mas em níveis diferentes. Na cv. CD120 em tratamentos desprovidos de estresse e com *H. seropedicae* (Hs e Hs/Az) a presença de AIA foi superior. Em relação a tratamentos com PEG (P/Hs, P/Az e P/Hs/Az) ambas as bactérias demonstraram desempenhos semelhantes associadas a cv. CD120. Para o sistema com cv. Frontana as quantidades de AIA foram menores (cerca de 10 vezes) se comparadas a cv. CD120, todavia destacaram-se os tratamentos sob a condição de estresse promovido pelo PEG e com *A. brasiliense* (P/Az e P/Hs/Az). Tratamentos sem PEG e com *H. seropedicae* (Hs e Hs/Az) e cv. Frontana demonstraram variações mínimas ao tratamento controle (C).

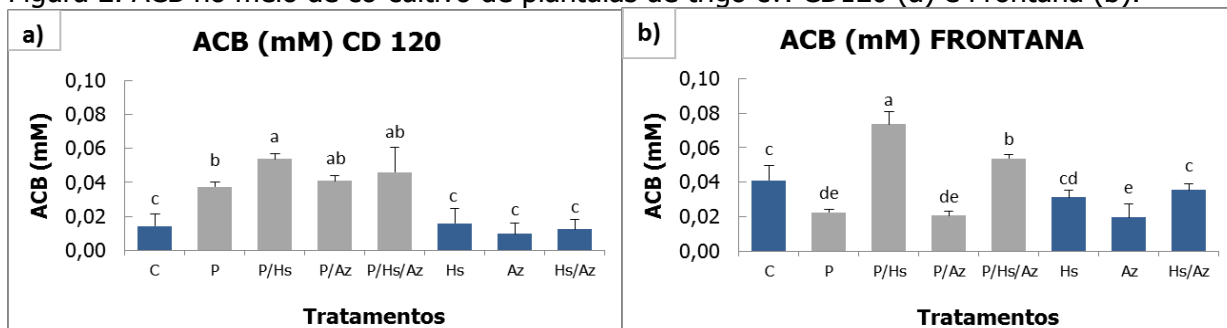


Figura 1. AIA no meio de co-cultivo de plântulas de trigo cv. CD 120 (a) e Frontana (b)



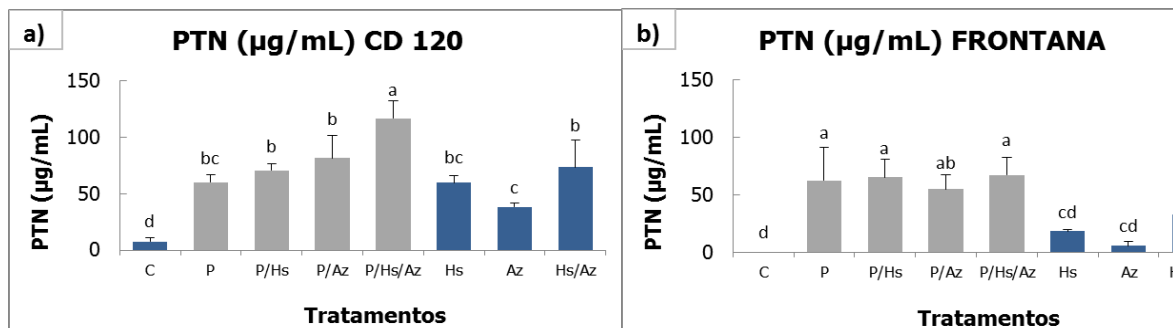
O resultado obtido no meio de co-cultivo nos controles (C e P) demonstrou aumento de ACB (Fig.2a e Fig.2b) em resposta a presença de PEG para a cv. CD120. As quantidades de ACB aumentaram no meio de co-cultivo especialmente na presença de PEG e *H. seropedicae* (P/Hs) para ambas as cultivares, essa resposta se deve provavelmente a atividade da ACC desaminase. Todos os tratamentos com *A. brasilense* sob a condição estressante (P/Az) não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles (P), confirmando a ausência da ACC desaminase. Para ambas as cultivares os controles (C) e tratamentos com bactérias sem estresse (Hs, Az e Hs/Az) não apresentaram expressivas alterações nas quantidades de ACB.

Figura 2. ACB no meio de co-cultivo de plântulas de trigo cv. CD120 (a) e Frontana (b).



A proteína total quantificada no meio de co-cultivo (Fig.3a e Fig.3b) demonstrou aumento na presença de PEG comparando os controles (C e P) para ambas as cultivares, confirmando a ação do PEG como agente estressante causador de morte celular no sistema de co-cultivo. A proteína total na cv. CD120 foi maior em tratamentos associativos desprovidos de estresse (Hs, Az e Hs/Az) comparado ao controle (C), indicando que a mudança ocorre em função das bactérias. Esta resposta não foi observada na maioria dos tratamentos com bactérias e PEG (P/Hs, P/Az e P/Hs/Az) e comparados aos controles com PEG (P) em ambas as cultivares, indicando morte celular da planta.

Figura 3. Proteínas totais no meio de co-cultivo de plântulas de trigo cv. CD120 (a) e Frontana (b).



CONCLUSÕES

O aumento das quantidades do fitormônio AIA indica que a associação da BPCV *H. seropedicae* SmR1 é mais efetiva com a cv. CD120, enquanto *A. brasiliense* AbV5 com a cv. Frontana. A cv. CD120 sofre o efeito de estresse da presença de PEG ao sintetizar etileno como resposta, enquanto *H. seropedicae* ajuda a diminuí-lo. O estresse promovido por PEG no meio de cultivo causa morte celular no sistema trigo-bactéria ou exsudação de proteínas pelas próprias cultivares ensaiadas. Estes dados corroboram os dados da literatura onde a interação benéfica entre planta e bactéria é específica quanto à variedade e a bactéria⁷.

REFERÊNCIAS

- (1) SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 29, p. 345-352, 2005.
- (2) PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, p.e1002064, 2011.
- (3) TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Editora Artmed, Brasil, 2009.
- (4) GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowki reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.2, p. 793-796, 1995.
- (5) PENROSE, M. D.; GLICK, B. R.; Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**. v. 118, n. 1, p. 10-15, 2003.
- (6) HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427. 1972.
- (7) BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History of the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 77, n. 3, p. 549-579. 2005.